

На правах рукописи

ПУПЛАМПУ ДЖОШУА БУЕР

**СИНТЕЗ ПОЛИАМИНОВ НА ПЛАТФОРМЕ ТЕТРАЗАМЕЩЕННЫХ ПО НИЖНЕМУ
ОБОДУ *p*-ТРЕТ-БУТИЛТИАКАЛИКС[4]АРЕНОВ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ДНК**

02.00.03 - Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Казань – 2015

Работа выполнена на кафедре органической химии Химического института им. А.М.Бутлерова федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор

Стойков Иван Иванович

Официальные оппоненты:

Никитина Лилия Евгеньевна,

доктор химических наук, профессор, зав. кафедрой общей и органической химии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», г.Казань

Калинин Алексей Александрович,

доктор химических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональных материалов ФГБУН «Институт органической и физической химии имени А.Е. Арбузова» КНЦ РАН, г.Казань

Ведущая организация:

ФГБУН «Институт химии» Коми научного центра Уральского отделения РАН, г.Сыктывкар.

Защита диссертации состоится «21» мая 2015 года в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 212.081.30 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлёвская, 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» <http://www.kpfu.ru>. Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим отправлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлёвская, 18, ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», отдел аттестации научно-педагогических кадров.

Автореферат разослан « ____ » марта 2015 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 212.081.30

кандидат химических наук

Якимова Людмила Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ¹

Актуальность темы исследования. Создание синтетических структур для целенаправленного распознавания субстратов является одним из приоритетных направлений современных исследований в области органической и супрамолекулярной химии. При конструировании рецепторных структур для связывания нуклеиновых кислот необходимо учитывать ряд факторов: сильная гидратация биополимеров, их самоассоциация, необходимость контроля их высокой конформационной подвижности. Комбинирование в рамках макроциклической системы различных по природе центров взаимодействия открывает новые возможности для дизайна «хозяев». Наиболее перспективными для распознавания нуклеиновых кислот и белков являются рецепторные системы на основе полиаммонийных и полигуанидиниевых структур и *n-трет*-бутилтиакаликс[4]ареновой платформы, функционализированной по нижнему ободу. Все вышеперечисленные группы обладают сродством к анионным и полианионным субстратам. Молекулярная платформа *n-трет*-бутилтиакаликс[4]арена способна пространственно предорганизовывать центры связывания рецептора. В связи с этим нами было предложено разработать подходы к синтезу потенциальных трансфекционных агентов на основе тетразамещенных по нижнему ободу *n-трет*-бутилтиакаликс[4]аренов, содержащих различные полиаминные фрагменты, различающиеся по количеству аминогрупп, длине алкильного линкера, наличию/отсутствию гидроксильных групп.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время общепризнанным является тот факт, что невозможно объяснить механизмы функционирования нуклеиновых кислот в «изолированном» состоянии, без учета их взаимодействий с молекулярными партнерами, определяющих механизмы и скорости их функционального ответа. Молекулярное распознавание, структурные и функциональные изменения нуклеиновых кислот определяют их активность в составе супрамолекулярных комплексов. С одной стороны, исследования в данной области носят фундаментальный характер и направлены на выяснение молекулярных механизмов функционирования белков и нуклеиновых кислот. С другой стороны, в последнее время одной из ключевых мотиваций этого направления является разработка биологически активных комплексов для решения задач геномной инженерии, медицины и фармакологии, конструирования сенсорных устройств. Анализ литературных данных показал, что функционализированные гуанидиниевыми группами каликсарены эффективно упаковывают ДНК в наночастицы, которые могут легко преодолевать клеточную мембрану, осуществляя тем самым трансфекцию. Несмотря на ряд успехов в области адресной доставки полинуклеиновых кислот в клетку с терапевтическими целями, задача получения макроциклов, которые будут применяться для геномной терапии, не решена.

Цели и задачи работы заключаются в разработке подходов к синтезу тетразамещенных по нижнему ободу *n-трет*-бутилтиакаликс[4]аренов, содержащих трис(2-аминоэтил)аминные, бис(3-аминопропил)аминные, *N*-(2-гидроксиэтил)этилендиаминные, *N*-(2-аминоэтил)пропанаминные и *N*-(3-(3-аминопропиламино)пропил)пропанаминные

¹ Автореферат оформлен в соответствии с ГОСТ Р 7.0.11 – 2011 ДИССЕРТАЦИЯ И АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ Структура и правила оформления

фрагменты, в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат* как потенциальных трансфекционных агентов, а также изучение в водных средах их комплексообразующей и агрегационной способности по отношению к модельной ДНК.

Научная новизна работы состоит в следующем:

- впервые синтезирован ряд тетразамещенных по нижнему ободу *n-трет*-бутилтиакаликс[4]аренов, содержащих трис(2-аминоэтил)аминные, бис(3-аминопропил)аминные, *N*-(2-гидроксиэтил)этилендиаминные, *N*-(1'-((3'-(2''-гидроксиэтил)-3'-[(метоксикарбонил)этил])-3'-азапропил)аминные, *N*-(2''-(2''-((3'-(2'-аминоэтиламино)-3'-оксопропил)(2''''-гидроксиэтил)амино)этиламинные и *N*-(18-амино-7-(2-гидроксиэтил)-3,10-диоксо-4,7,11,15-тетра-азатетрадецил)аминные фрагменты, в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат*;

- впервые разработан синтетический подход к получению нового типа потенциального трансфекционного агента на основе *n-трет*-бутилтиакаликс[4]арена, содержащего третичные аминогруппы и терминальные сложноэфирные и гидроксильные функции;

- впервые установлены факторы, влияющие на эффективность взаимодействия с биомембраной производных *n-трет*-бутилтиакаликс[4]арена, функционализированных по нижнему ободу трис(2-аминоэтил)амиными фрагментами;

- впервые методом динамического светорассеяния установлена зависимость между пространственной структурой производных тиакаликс[4]арена, типом и количеством аминогрупп и эффективностью конденсации ДНК.

Теоретическая и практическая значимость работы. Синтезированы новые тетразамещенные производные *n-трет*-бутилтиакаликс[4]арена, функционализированные по нижнему ободу трис(2-аминоэтил)амиными, бис(3-аминопропил)амиными, *N*-(2-гидроксиэтил)этилендиаминными, *N*-(2-аминоэтил)пропанаминными, *N*-(3-(3-аминопропиламино)пропил)пропанаминными фрагментами, в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат*. Предложен и реализован подход к синтезу *n-трет*-бутилтиакаликс[4]аренов, функционализированных по нижнему ободу трис(2-аминоэтил)амиными фрагментами, позволяющий формировать один или два циклических мостиковых фрагмента. Показано, что взаимодействие синтезированных производных тиакаликс[4]арена с модельными биомембранами на основе дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) зависит не только от гидрофильных – гидрофобных взаимодействий, но и от пространственной организации соединения и количества терминальных первичных аминогрупп в макроцикле. Методом динамического светорассеяния установлено влияние пространственной структуры макроцикла, типа и количества аминогрупп на эффективность конденсации ДНК. Продемонстрирована возможность упаковывания ДНК из тимуса телёнка в наноразмерные частицы *n-трет*-бутилтиакаликс[4]аренами в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат*, функционализированными по нижнему ободу полиамиными фрагментами.

Методология и методы исследования. При выполнении данного исследования для установления структуры и состава тетразамещенных по нижнему ободу производных *n-трет*-бутилтиакаликс[4]арена был применен набор физических и физико-химических методов, таких как ИК- и ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия и элементный анализ.

Методы УФ спектроскопии и динамического светорассеяния были использованы для исследования взаимодействия макроциклов с ДНК.

Положения, выносимые на защиту:

1. Оптимизация условий аминолита полиаминами тетраэфиров на основе *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена и синтез ряда новых тетразамещенных по нижнему ободу *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов, содержащих трис(2-аминоэтил)аминные, бис(3-аминопропил)аминные, *N*-(2-гидроксиэтил)этилендиаминные, *N*-(1'-((3'-(2''-гидроксиэтил)-3'-[(метоксикарбонил)этил])-3'-азапропил)аминные, *N*-(2''-(2''-((3'-(2'-аминоэтиламино)-3'-оксипропил)(2'''-гидроксиэтил)амино)этиламинные и *N*-(18-амино-7-(2-гидроксиэтил)-3,10-диоксо-4,7,11,15-тетра-азатетрадецил)аминные фрагменты, в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат*.

2. Синтез новых типов строительных блоков на основе тетразамещенных по нижнему ободу *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат*, содержащих сложноэфирные и гидроксильные группы, имеющих широкие возможности применения для создания супрамолекулярных архитектур, а также получение на их основе разветвлённых полиаминов путем введения в структуру макроцикла фрагмента метилакрилата и дальнейшего аминолита сложноэфирных групп диаминами с малой длиной цепи.

3. Закономерности, связывающие структуру синтезированных производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена, функционализированных по нижнему ободу аминными фрагментами, в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат* со способностью взаимодействия с биомембраной и к эффективной конденсации ДНК.

Личный вклад автора. Автор принимал участие в постановке цели и задач исследования, анализе литературных данных, выполнении экспериментальной работы, обсуждении результатов и формулировке выводов, подготовке статей и тезисов докладов. Все соединения, представленные в диссертационной работе, синтезированы соискателем лично.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов проведённых исследований подтверждается использованием комплекса современных физических и физико-химических методов анализа.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на XI Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2011), Всероссийской конференции «Органический синтез: химия и технология» (Екатеринбург, 2012), XV Молодежной школе-конференции по органической химии (Уфа, 2012) и Всероссийской школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи и 4 тезиса докладов.

Объём и структура работы. Диссертационная работа изложена на 120 страницах машинописного текста, включает 28 рисунков и 9 таблиц. Состоит из введения, трёх глав, выводов и списка использованных библиографических источников, включающего 119 ссылок.

В первой главе представлен обзор литературных данных по синтезу и функционализации (тиа)каликс[4]аренов аминными, аммонийными и гуанидиниевыми группами и их взаимодействию с нуклеиновыми кислотами.

Основные результаты экспериментальных исследований, их обсуждение приведены во второй главе. Рассмотрены условия реакций и различные подходы к получению ряда новых тетразамещенных по нижнему ободу *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов, содержащих трис(2-аминоэтил)аминные, бис(3-аминопропил)аминные, *N*(2-гидроксиэтил)этилендиаминные, *N*-(1'-((3'-(2''-гидроксиэтил)-3'-[(метоксикарбонил)этил])-3'-азапропил)аминные, *N*-(2''-(2''-((3'-(2'-аминоэтиламино)-3'-оксопропил)(2'''-гидроксиэтил)амино)этиламинные и *N*-(18-амино-7-(2-гидроксиэтил)-3,10-диоксо-4,7,11,15-тетра-азатетрадецил)аминные фрагменты, в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат*. Также обсуждаются закономерности, связывающие структуру синтезированных производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена, функционализированных по нижнему ободу полиаминными фрагментами, в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат* со способностью взаимодействия с биомембраной и к эффективной конденсации ДНК.

Экспериментальная часть работы, включающая описание проведённых синтетических, физико-химических и физических экспериментов, а также экспериментов по изучению агрегации, приведена в третьей главе диссертации.

Работа выполнена на кафедре органической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета, является частью исследований по основному научному направлению «Синтез, строение, реакционная способность и практически полезные свойства органических, элементоорганических и координационных соединений». Запись масс-спектров выполнена в лаборатории физико-химического анализа Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова И.Х. Ризвановым.

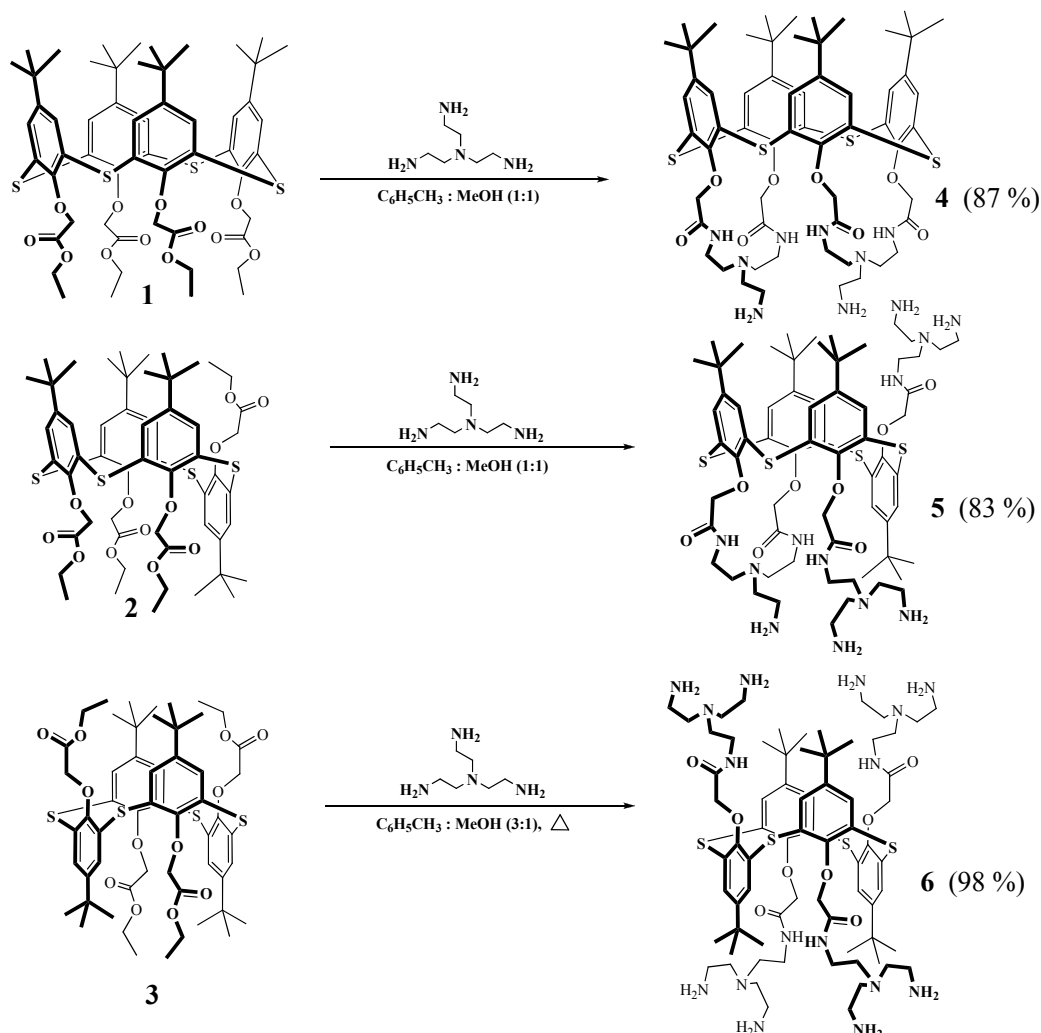
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Синтез *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов, функционализированных по нижнему ободу трис(2-аминоэтил)аминными фрагментами

Среди подходов, часто используемых для синтеза амидных производных тиакс[4]аренов, предпочтительным по сравнению с использованием карбоновых кислот с активирующими агентами или с использованием реакционноспособных ацилхлоридных групп становится прямой аминолиз сложноэфирных фрагментов. Первоначально, на примере трис(2-аминоэтил)амин (TREN) нами был изучен аминолиз тетраэфиров *n*-трет-бутилтиакс[4]арена в конфигурациях *конус* **1**, *частичный конус* **2** и *1,3-альтернат* **3** (варьировалась природа растворителей, температура и время реакции). Оказалось, что реакция тетраэфира *конус* **1** с избытком амина (в присутствии или в отсутствие растворителя) всегда приводит к смеси продуктов, в ходе разработки которой был получен целевой продукт **4**. Аналогичная методика была применена и в случае тетраэфира **2** в конфигурации *частичный конус*. Был выделен целевой продукт **5** с выходом 83%. Кроме того, обнаружено, что взаимодействие тетраэфира **2** с избытком трис(2-аминоэтил)амин всегда приводит к трудноразделимой смеси продуктов. Реакция с участием макроцикла **3** в конфигурации *1,3-альтернат* протекала успешно только при нагревании реакционной смеси с использованием

в качестве растворителя смеси толуола и метанола в соотношении 3:1. В результате был получен продукт **6** с выходом 98%.

Было показано, что взаимодействие двух полифункциональных реагентов (тетраэфиров **1-3** и трис(2-аминоэтил)амин) в условиях избытка полиамина приводит к образованию целевого соединения, содержащего восемь первичных аминогрупп, только в случае конфигурации *1,3-альтернат* (макроцикл **6**). Напротив, циклические продукты образуются в случае конфигураций *конус 1* и *частичный конус 2*.

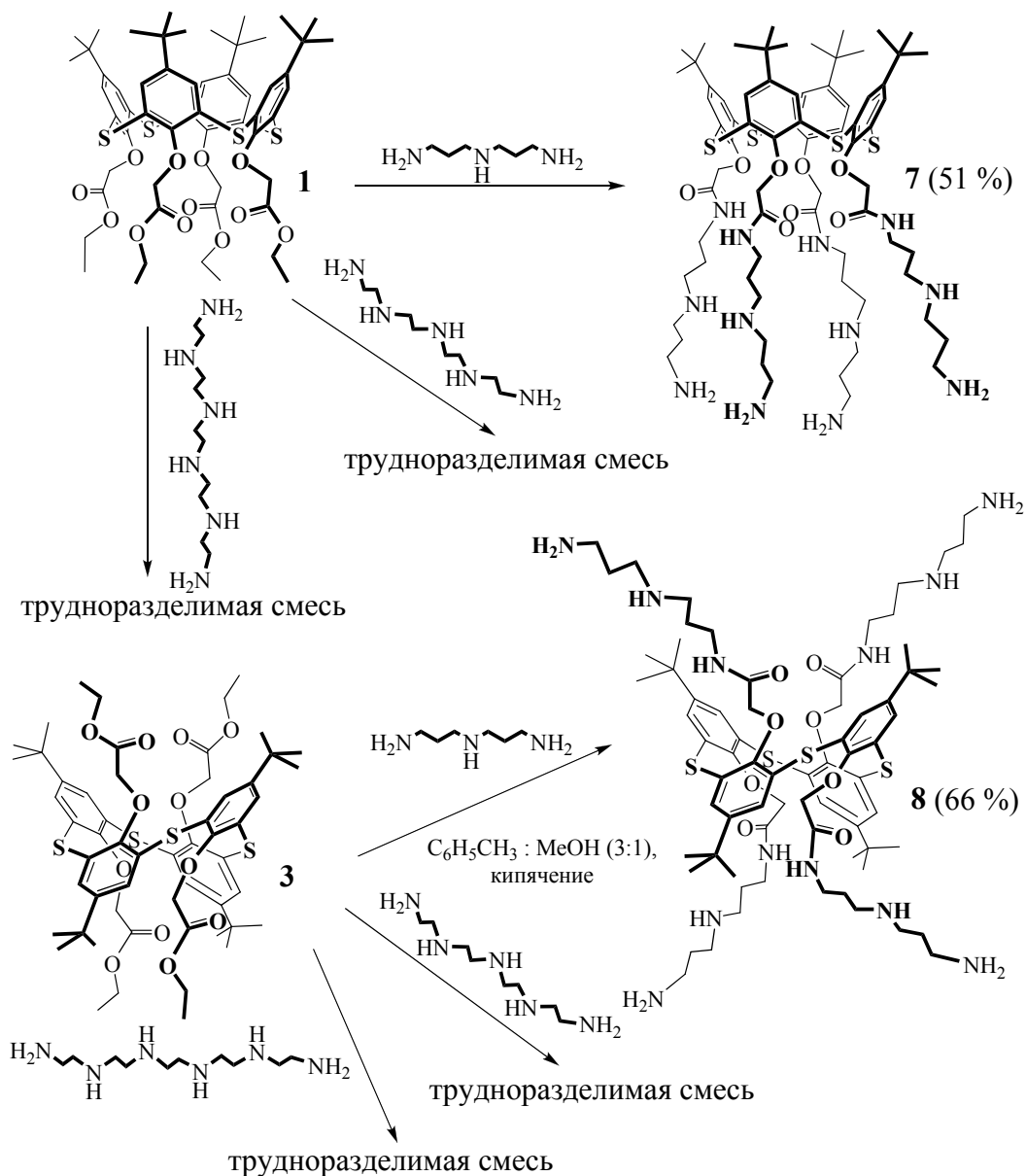


Таким образом, синтезированы новые производные тетразамещенных тиакаликс[4]аренов, функционализированных фрагментами трис(2-аминоэтил)амин по нижнему ободу, в конфигурациях *конус 4*, *частичный конус 5* и *1,3-альтернат 6*. Структуры полученных соединений охарактеризованы с помощью ЯМР ^1H и ^{13}C и ИК-спектроскопии и MALDI-TOF масс-спектрометрии.

2 Синтез *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов, функционализированных по нижнему ободу полиаминными фрагментами

Полученные при изучении аминолита тетраэфиров на основе *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов **1-3** трис(2-аминоэтил)амином результаты свидетельствуют о том, что из трех изученных конфигураций *конус*, *частичный конус* и *1,3-альтернат* по химическим свойствам наиболее различаются первая и последняя. Кроме того, применение разветвленного полиамина (TREN) не привело в случае конфигураций *конус* и *частичный*

конус к целевым макроциклическим полиаминам — тиакаликс[4]аренам с восемью терминальными первичными аминогруппами. В связи с этим было изучено взаимодействие тетраэфирных производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов **1** и **3** с линейными полиаминами: бис(3-аминопропил)амином, тетраэтиленпентамином (ТЕРА) и пентаэтиленгексамином (РЕНА).



При проведении аминолита макроциклов **1** и **3** тетраэтиленпентамином и пентаэтиленгексамином варьировалась природа растворителей, а также их соотношение и температура. Было обнаружено, что, независимо от условий проведения аминолита, взаимодействие ТЕРА или РЕНА с тетраэфирами *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена (**1** и **3**) всегда приводило к трудно разделяемым смесям продуктов аминолита. В спектрах ЯМР ^1H наблюдалась смесь продуктов реакции. Даже проведение реакций в условиях значительных избытков полиаминопроизводных (ТЕРА или РЕНА) не привело к целевым продуктам.

Образующиеся смеси продуктов (согласно масс-спектрам) указывают на вероятное существование конкуренции между растворителем и реакционными центрами, ведущей к образованию двух типов продуктов тетразамещения: соединения с четырьмя концевыми аминогруппами и соединения, содержащего и аминокраун-группу, и две концевые

аминогруппы. Хотя такое явление циклизации не удивительно, оно описано лишь для диаминов и полиаминов с короткими алкильными линкерами (до пяти линкерных атомов). Таким образом, наблюдаемые циклические продукты с более длинными линкерными цепями $(-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_4$ или $-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_5-$) являются нетипичными продуктами подобных реакций.

В отличие от полиаминов тетраэтиленпентамина (ТЕРА) и пентаэтиленгексамина (ПЕНА), взаимодействие тетраэфиров *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов (**1** и **3**) с избытком бис(3-аминопропил)амина привело к образованию тетразамещенных продуктов **7** и **8** соответственно. В то время как реакция с участием конфигурационного изомера *конус* **1** привела к хорошим выходам продукта **7** в отсутствие растворителя при температуре 60 °С, реакция с участием изомера *1,3-альтернат* **3** с бис(3-аминопропил)амином протекала с образованием целевого продукта **8** только при нагревании смеси исходных веществ в смеси растворителей толуол : метанол в соотношении 3 : 1.

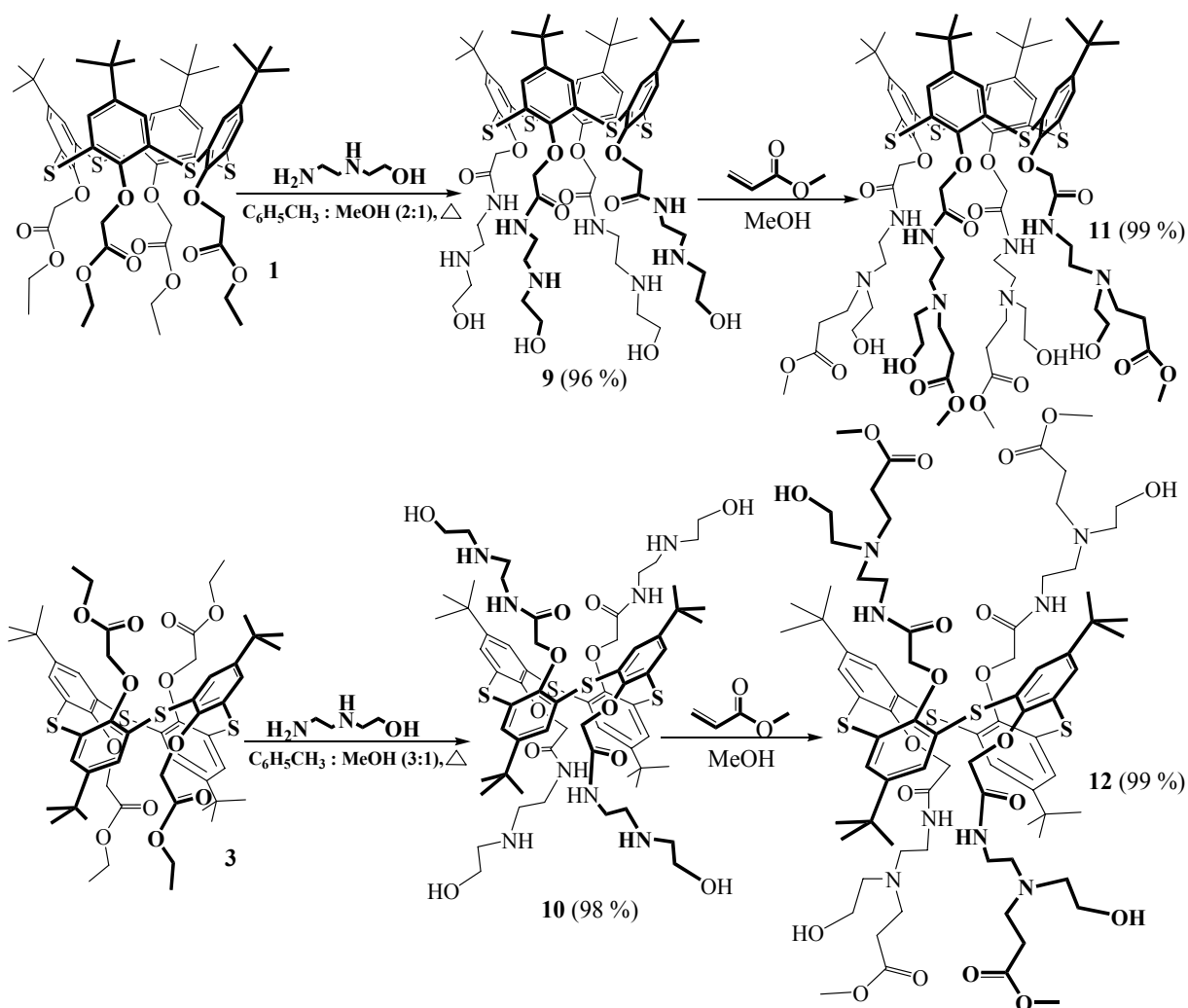
3 Синтез производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена, функционализированных по нижнему ободу фрагментами N-(2-гидроксиэтил)этилендиамина, и их взаимодействие с метилакрилатом

Для введения дополнительных возможностей к образованию водородных связей в макроцикле, в дополнение к свойствам, обусловленным наличием аминогрупп, был выбран полиамин N-(2-гидроксиэтил)этилендиамин, содержащий две аминогруппы и гидроксильную группу, разделенные этиленовыми линкерами. Аминолиз тетраэфиров *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена (**1** и **3**) N-(2-гидроксиэтил)этилендиамином привел к тетразамещенным продуктам (**9** и **10**), каждый фрагмент которых содержит концевую гидроксильную группу, отделенную от вторичной аминогруппы этиленовым линкером.

Модификация сложноэфирных групп является одним из классических подходов для введения разнообразных связывающих фрагментов в структуру макроциклов. Попытка изменить общую плотность заряда (рК вторичных аминов) путем введения постоянного положительного заряда через линкер с помощью гуанидирующих агентов: S-метил изотиоуроний сульфата или 3,5-диметил-1Н-пиразол-1-карбоксимидамид нитрата, не привела к образованию целевых продуктов. Реакции не проходили, либо приводили к трудно разделяемой смеси продуктов даже при варьировании условий протекания реакций. Поэтому синтезированные *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арены **9** и **10**, содержащие вторичные аминогруппы, были вовлечены в реакцию Михаэля с метилакрилатом в метаноле при комнатной температуре. Продукты **11** и **12** были получены с высокими выходами (99 %).

Дальнейший гидролиз соединений **11** и **12**, содержащих метилпропаноатные фрагменты, с целью получения концевых карбоксильных групп в мягких условиях (раствор LiOH / ТГФ) привел к трудно разделяемым смесям продуктов.

Таким образом, были синтезированы новые производные тетразамещенного *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена, функционализированные по нижнему ободу фрагментами N-(2-гидроксиэтил)этилендиамина, в конфигурациях *конус* (**9** и **11**) и *1,3-альтернат* (**10** и **12**).



4 Синтез *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов, функционализированных по нижнему ободу N-(2-аминоэтил)пропанамидными и N-(3-(3-аминопропиламино)пропил)пропанамидными фрагментами

Далее был изучен аминолиз сложноэфирных групп соединений **11** и **12** полиаминами (этилендиамином и бис(3-аминопропил)амином), которые различаются количеством аминогрупп и длиной алкильных цепей и, соответственно, реакционной способностью. Взаимодействие производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена **11** и **12** с этилендиамином или бис(3-аминопропил)амином привело к целевым продуктам **13-15** с выходом 99 %. В спектре ЯМР ^1H соединений **13-15** наблюдается практически идентичный набор сигналов протонов (рис.1). Отсутствие синглета протонов метоксильной группы в области 3.50-3.65 м.д. и появление дополнительного синглета протонов амидной группы в слабом поле при 7.96 м.д. свидетельствует об успешном протекании реакции аминолиза. Присутствие перекрывающихся мультиплетов в области 2.38-2.64 м.д. в сильном поле, относящихся к различным протонам метиленовых групп, сильно усложняет интерпретацию спектра.

Рис. 1. Спектры ЯМР ^1H соединений **13-15** (в ДМСО- d_6 , 25°C, 400 МГц).

Согласно кросс-пикам в двумерных спектрах ЯМР ^1H - ^{13}C HSQC продуктов **13-15**, сигналы были приписаны соответствующим метиленовым группам. Данные масс-спектрометрии (соединение **13**: $m/z[\text{M}+\text{H}]^+ = 1753.6$, $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1775.5$, соединение **14**: $m/z[\text{M}+\text{Na}]^+ = 2059.2$ и соединение **15**: $m/z[\text{M}+\text{H}]^+ = 1753.5$, $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1776.5$) подтвердили предполагаемые структуры продуктов. Все полученные соединения были охарактеризованы методами ЯМР ^1H , ^{13}C , ^1H - ^{13}C HSQC, ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии.

5 Взаимодействие производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена с модельными биомембранами на основе дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC)

С целью исследования способности синтезированных соединений к взаимодействию с биомембранами и, как следствие, к направленному переносу «упакованной ДНК» через биомембрану, мы выбрали *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арены **4-6**, функционализированные по нижнему ободу трис(2-аминоэтил)аминными фрагментами. Наш выбор связан со структурной вариабельностью – в их структуре сочетаются линейные и разветвленные полиаминные цепочки, и они могут быть получены в трёх структурных конфигурациях. Таким образом, нами было изучено взаимодействие с модельной биомембраной производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена, функционализированных по нижнему ободу трис(2-аминоэтил)аминными фрагментами. В качестве модельной биомембраны нами были выбраны монодисперсные везикулы дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) диаметром 100 нм. По изменению температуры фазового перехода T_m можно определить наличие взаимодействия между мембраной и соединением. Температура фазового перехода (T_m) липидных везикул была определена методом турбидиметрического титрования на спектрофотометре при длине волны 400 нм. Полученные зависимости оптической плотности от температуры аппроксимировали параметрическим уравнением, полученным на основе уравнения Вант-Гоффа для фазовых переходов (уравнение 1).

$$y(x) = a(x + 273) + b + \frac{c(x + 273) + d}{1 + e^{\frac{H(T-x)}{k(T+273)(x+273)}}} \quad (1),$$

где x – значения температуры, a , b , c , d – аппроксимационные параметры, H – энтальпия фазового перехода, T – температура фазового перехода. В полученном уравнении в качестве $y(x)$ используются нормированные значения оптической плотности.

На рисунке 2 представлен график зависимости нормированного значения оптической плотности от температуры на примере соединения **4** с DPPC (1:75). Кривая построена по аппроксимационному уравнению с оптимизированными значениями параметров. В результате математической обработки были получены значения T_m для различных мольных соотношений исследуемых соединений к липиду.

Из таблицы 1 видно, что при мольном соотношении 1:100 (соединение : DPPC), наблюдается небольшое изменение T_m липосом DPPC в присутствии соединений **4** и **5**. В присутствии же соединения **6** T_m (41.2 ± 0.1) практически не изменилась, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия **6** с липосомами DPPC при данном мольном соотношении, в то время как последующее увеличение мольной концентрации (соединение : DPPC = 1:75) соответствует увеличению T_m . Полная сольubilизация (разрушение) липосом наблюдается только в случае соединения **5** при данной концентрации (1:75).

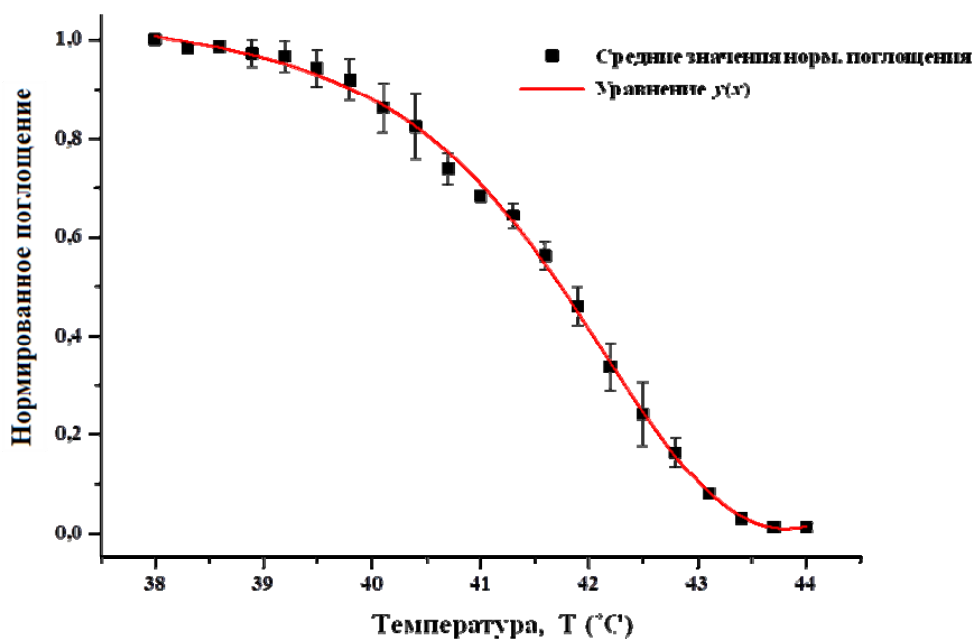


Рис. 2. График зависимости нормированного значения оптической плотности от температуры на примере соединения **4** с DPPC (1:75) и кривая, построенная по аппроксимационному уравнению (1) с оптимизированными значениями параметров.

Таблица 1. Температуры фазового перехода T_m смеси соединений (**4-6**) и DPPC.

Молярное соотношение соединение : DPPC	4 : DPPC	5 : DPPC	6 : DPPC
0 : 1	41.0 ± 0.2	41.0 ± 0.2	41.0 ± 0.2
1 : 100	41.4 ± 0.1	41.4 ± 0.1	41.2 ± 0.1
1 : 75	41.8 ± 0.2	-	41.5 ± 0.1
1 : 50	-	-	41.7 ± 0.1

\pm , стандартное отклонение

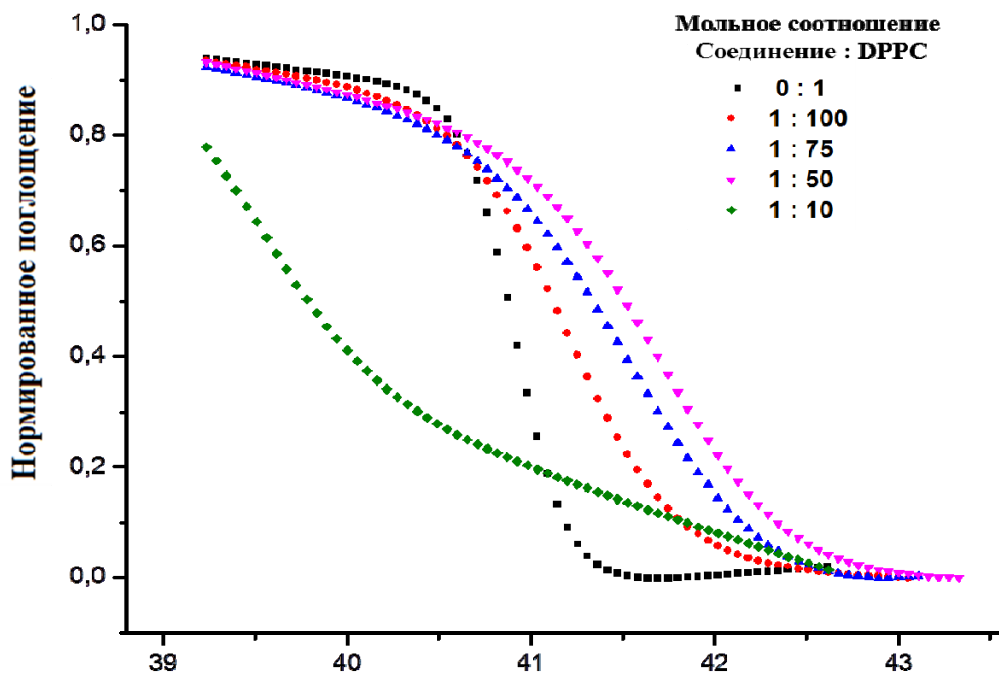


Рис. 3. Спектрофотометрическое титрование соединения **6** (7, 9.3, 14 и 70 μ M) 0.7 mM раствором липосом DPPC при 400 нм.

Таким образом, небольшое увеличение молярной концентрации соединения **5** привело к солюбилизации липосом. Этот эффект для соединения **4** наблюдается только при молярном соотношении 1:75 (**4** : DPPC). Несмотря на то, что соединения **4** и **6** симметричны, выраженное гидрофобное ядро тиакаликсарена **6** недоступно для взаимодействия с гидрофобными хвостами липидных мембран потому, что в отличие от макроциклов **4** и **5**, окружено гидрофильными группами. Солюбилизация в данном случае происходит только при молярном соотношении 1:50, при превышении которого наблюдается полное разрушение липосом (рис.3). Следует отметить, что в соединении **6** присутствует восемь концевых аминогрупп против пяти у соединения **5** и двух у соединения **4**. Очевидно, что взаимодействие с мембраной зависит не только от гидрофильных – гидрофобных взаимодействий, но и от пространственной организации соединений и количества аминогрупп в них.

6 Взаимодействие полиаминов на основе тетразамещенных по нижнему ободу *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов с ДНК

Способность синтезированных производных тиакаликсарена **7** и **8** взаимодействовать с ДНК была изучена методом УФ спектроскопии. Были записаны спектры поглощения ДНК в присутствии различных количеств производных тиакаликс[4]арена для всех полученных производных за исключением тех случаев, когда растворимость в водном буфере была слишком низкой (буфер 10мМ Трис-НСl, 10мМ NaCl, pH=7.4). Известно, что успешное взаимодействие небольших молекул с ДНК приводит к образованию ассоциатов, характеризующихся смещением полосы поглощения ДНК и/или соответствующими изменениями в поглощении смеси. Таким образом, в отсутствие взаимодействия поглощение отдельных компонентов в растворе должно иметь аддитивный характер. При увеличении концентрации производных тиакаликс[4]арена (от 1.94 μ М до 5.82 μ М) в смеси с ДНК из тимуса телёнка (44.1 μ М) наблюдался гиперхромный эффект в области 257 нм для всех исследованных соединений (рис.4 и 5, на примере соединений **7** и **8**).

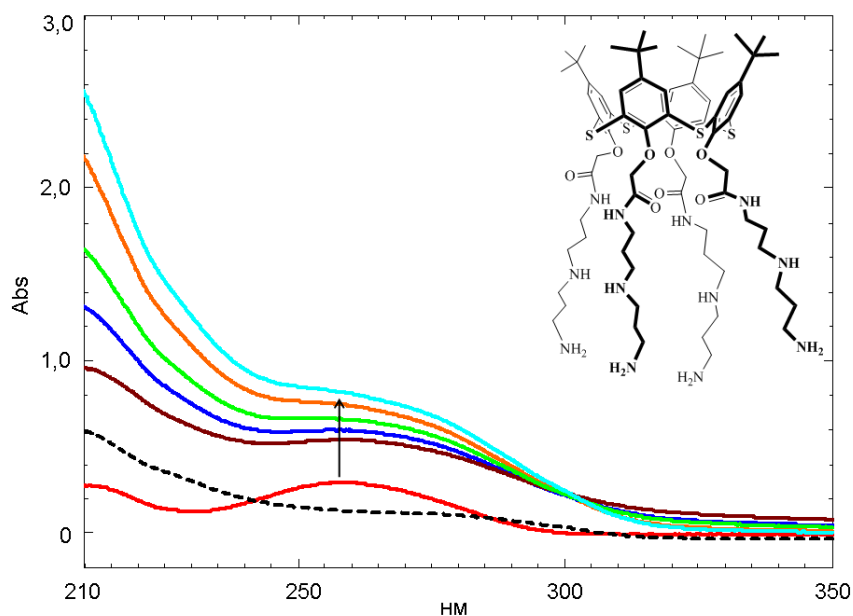


Рис. 4. Спектры поглощения ДНК из тимуса телёнка в отсутствие лигандов (нижняя линия) и при увеличении концентрации лиганда **7**: 1.90, 2.90, 3.59, 4.85 и 5.82 μ М. Пунктирная линия: спектр поглощения **7** (1.94 μ М).

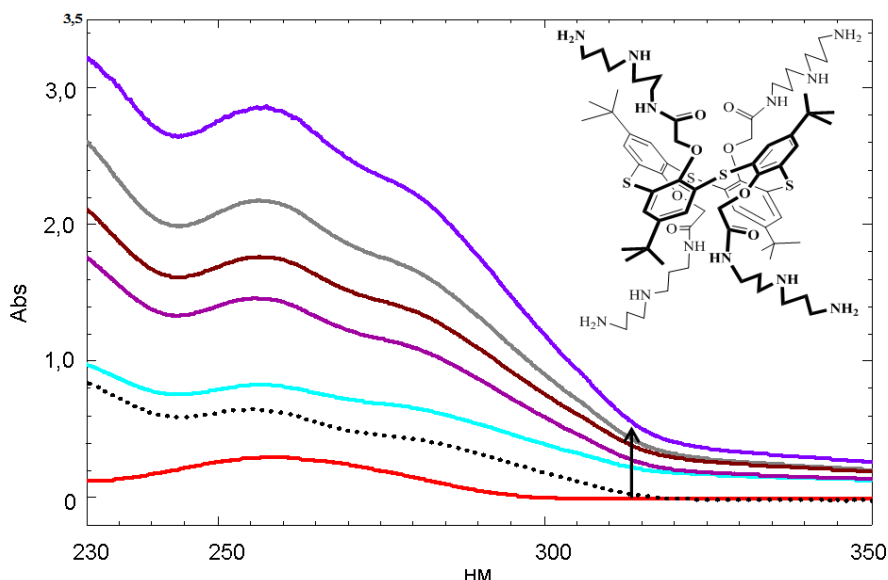


Рис. 5. Спектры поглощения ДНК из тимуса телёнка в отсутствие лигандов (нижняя линия) и при увеличении концентрации лиганда **8**: 1.90, 2.90, 3.59, 4.85 и 5.82 μM . Пунктирная линия: спектр поглощения **8** (1.94 μM).

Несмотря на то, что интенсивность поглощения в области 257 нм для ДНК из тимуса телёнка возросла с увеличением концентрации лигандов, аддитивности поглощений индивидуальных компонентов для всех исследованных соединений не наблюдалось. Также в спектре ассоциатов **7**/ДНК из тимуса телёнка в области 300 нм наблюдалась изобестическая точка (рис.4). Изменения в спектрах указывают на наличие взаимодействия между соединениями и ДНК.

Одним из обязательных свойств эффективных трансфекционных агентов является их способность образовывать наноразмерные агрегаты с молекулами ДНК. В растворе ДНК находится в глобулярной форме, причем глобула может быть практически развернутой, а может быть довольно компактной, что сильно зависит от ионной силы раствора, особенно от присутствия катионов металлов. Способность ДНК изменять конформацию реализуется при транспорте ДНК через клеточную мембрану. В связи с этим биомолекулы или синтетические вещества, способствующие образованию компактной конформации, имеют большое значение для невирусного переноса (трансфекции) нуклеиновых кислот.

Для определения эффективности конденсации ДНК синтезированными соединениями мы использовали метод динамического светорассеяния (ДСР). По сравнению с остальными методами, такими как микроскопия и гель-электрофорез, ДСР – быстрый метод для определения эффективности конденсации с точки зрения как пробоподготовки, так и обработки и записи результатов измерений.

При определении концентрации ДНК ($[G]$, в молях фосфатов) использовали значение молярного коэффициента экстинкции в максимуме поглощения ДНК $\varepsilon_{260} = 6600 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Величины «молярного соотношения $[H] / [G]$ » (отношение молярной концентрации макроцикла к молярной концентрации нуклеотидов) рассчитывали как отношение общей концентрации ДНК ($[G]$) к концентрации тиакаликс[4]арена ($[H]$).

Тиакаликсарены **4-6** различаются по конфигурации макроцикла (*конус*, *частичный конус* и *1,3-альтернат*) и количеству аминогрупп. В целом, увеличение молярного соотношения $[H] / [G]$ (макроцикл/ДНК из тимуса телёнка) соответствует понижению

размеров образующихся частиц. Взаимодействие соединения **4** в конфигурации *конус* с ДНК из тимуса телёнка привело к уменьшению размеров частиц с 2612 нм (95.3 %) до 101.7 нм (96.5 %) при мольном соотношении $[H] / [G] = 1.31$. Увеличение концентрации тиакаликсаренов **4-6** приводит к увеличению размеров агрегатов. В случае избытка макроцикла **4**, последний способен к самоассоциации или формированию кластеров вокруг образовавшегося ассоциата **4**/ДНК. Соединения **5** и **6** конденсировали ДНК при данном мольном соотношении $[H] / [G]=1.0$. Для соединения **6** в конфигурации *1,3-альтернат* минимальный размер агрегатов с ДНК, 334.4 нм (97.4%), был получен при мольном соотношении $[H] / [G] = 2.81$. При таком же мольном соотношении ($[H] / [G] = 2.81$), в случае конфигурационного изомера *частичный конус* **5**, образовались относительно крупные частицы с размером 718 нм (91.6%) для ассоциатов **5**/ДНК. Соединение **4** в конфигурации *конус* очень эффективно упаковывает ДНК в наноразмерные частицы в отличие от конфигурационного изомера *1,3-альтернат* (**6**), который конденсирует ДНК в частицы размером порядка 300 нм.

Чтобы выявить факторы, определяющие эффективность конденсации в зависимости от конфигурации, методом ДСР было изучено взаимодействие производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена, функционализированных по нижнему ободу бис(3-аминопропил)амидными фрагментами, в конфигурациях *конус* **7** и *1,3-альтернат* **8** с ДНК из тимуса телёнка (рис.6). Оказалось, что во всех случаях образуются полидисперсные системы. Интересно отметить, что и конфигурационный изомер *конус*, и изомер *1,3-альтернат* образуют наноразмерные ассоциаты. При мольном соотношении макроцикл / ДНК, равном 1.0, размер основных частиц ассоциатов **7**/ДНК составил 74.8 нм (68.9%), в то время как размер агрегатов с конфигурационным изомером *1,3-альтернат* **8**/ДНК составил 99.1 нм (98.8%). Таким образом, введение полиаминных групп в платформу тиакаликс[4]арена приводит к эффективной конденсации ДНК до нанометрового размера.

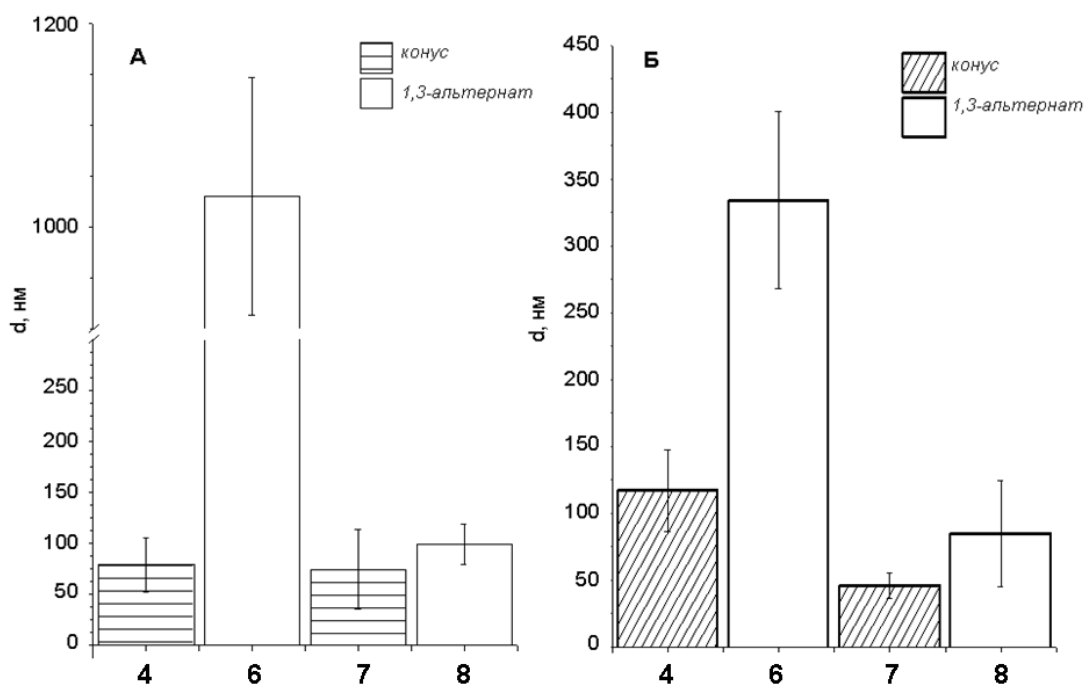


Рис. 6. Влияние конфигурации макроцикла и типа полиаминного заместителя на нижнем ободу на эффективность конденсации ДНК: А) $[макроцикл] / [ДНК] = 1.0$; Б) $[макроцикл] / [ДНК] = 2.81$, в буфере (10 мМ Трис-НСl, 10 мМ NaCl, pH=7.4).

При сравнении производных тиакаликс[4]арена, функционализированных фрагментами трис(2-аминоэтил)амин (4 и 6), с макроциклами, функционализированными бис(3-аминопропил)амидными фрагментами (7 и 8) в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат*, заметно, что при мольном соотношении макроцикл / ДНК, равном 1.0, все изученные соединения вне зависимости от конфигурации проявляли одинаковую способность к упаковке ДНК (средний размер частиц около 100 нм), за исключением производного 6 в конфигурации *1,3-альтернат*, которое образует частицы размером более 1 мкм (рис.6, А). При более высоком мольном соотношении $[Н] / [G] = 2.81$ производные трис(2-аминоэтил)амин в конфигурации *1,3-альтернат* конденсировали ДНК примерно до 330 нм, в то время как другие макроциклы (4, 7, 8) способствовали сворачиванию ДНК до размеров, близких к 100 нм диапазону (рис.6, Б). В целом, соединения в конфигурации *конус* более эффективны, чем в конфигурации *1,3-альтернат*. Кроме того, бис(3-аминопропил)амидные производные оказались намного эффективнее, чем производные трис(2-аминоэтил)амин. Эффективность конденсации уменьшается в ряду $7 > 4 > 8 \gg 6$.

Далее методом динамического светорассеяния показано, что взаимодействие соединений 9 и 10 с ДНК не привело к образованию наноразмерных агрегатов. Даже при высоком мольном соотношении «соединение / ДНК», равном 13.13, в случае соединений 9 и 10 образуются агрегаты сравнительно больших размеров с высоким индексом полидисперсности.

В отличие от изученных ранее соединений, макроцикл 11 упаковывает ДНК тимуса теленка в частицы с размером 145 нм уже при мольном соотношении $[11] / [ДНК] = 0.26$ с мономодальным распределением и низким индексом полидисперсности, равным 0.12. Интересно, что при увеличении мольного соотношения $[11] / [ДНК]$ происходит увеличение и размеров образующихся частиц. В данном случае система также остается монодисперсной с низким индексом полидисперсности вне зависимости от избытка соединения 11.

Соединения 13 и 15 оказались неэффективны при упаковке ДНК в отличие от соединений 11 и 12. Увеличение мольного соотношения привело лишь к уменьшению размера частиц 13 / ДНК. В данном случае размер основной фракции частиц (79.0 %) составил 92 нм с индексом полидисперсности 0.39 при мольном соотношении $[13] / [ДНК]$, равном 13.13.

Таким образом, предполагалось, что соединения 13 и 15, благодаря дополнительным концевым *N*-2-аминоэтиламинными фрагментам, будут иметь большую способность к упаковке ДНК, чем соединения 11 и 12. Однако было показано, что при добавлении соединений 13 и 15 к раствору ДНК образуются частицы микронного размера независимо от мольного соотношения макроцикл/ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

1. Синтезирован ряд новых тетразамещенных по нижнему ободу *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов, содержащих трис(2-аминоэтил)аминные, бис(3-аминопропил)аминные, *N*-(2-гидроксиэтил)этилендиаминные, *N*-(1'-((3'-((2''-гидроксиэтил)-3'-[(метоксикарбонил)этил])-3'-азапропил)аминные, *N*-(2''-(2''-((3'-((2'-аминоэтиламино)-3'-оксипропил)(2'''-гидроксиэтил)амино)этиламинные и *N*-(18-амино-7-(2-гидроксиэтил)-3,10-

диоксо-4,7,11,15-тетра-азатетрадецил)аминные фрагменты в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат*. Структуры полученных соединений подтверждены комплексом физических и физико-химических методов (одномерной ЯМР ^1H , ^{13}C , двумерной ЯМР HSQC ^1H - ^{13}C , ИК спектроскопией, масс-спектрометрией).

2. Оптимизированы условия аминолиза полиаминами тетраэфиров на основе *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат*.

3. Предложен и реализован простой способ получения разветвлённых тетразамещённых по нижнему ободу *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов, функционализированных первичными и третичными аминогруппами, в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат* путем введения в структуру макроцикла фрагмента метилакрилата и дальнейшего аминолиза сложноэфирных групп диаминами с малой длиной цепи.

4. Предложен новый тип синтетических рецепторов на основе стереоизомера *1,3-альтернат n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена, содержащий сложноэфирные, гидроксильные и третичные аминогруппы, способный упаковывать ДНК до размеров наночастиц (51-85 нм).

5. Установлено, что в изученном ряду соединений эффективность взаимодействия производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена, функционализированных по нижнему ободу трис(2-аминоэтил)аминными фрагментами, с биомембраной на основе дипальмитоилфосфатидилхолина зависит не только от гидрофобности макроцикла, но и от его пространственной организации и количества аминогрупп: наиболее эффективно, без разрушения бислойной мембраны, с последней взаимодействует стереоизомер *1,3-альтернат* с максимальным (восемь) количеством первичных групп.

6. Методом динамического светорассеяния установлено, что все синтезированные соединения склонны к кластеризации и самоагрегации, что и наблюдается уже при концентрации $4.2 \cdot 10^{-4}$ М.

7. Установлено, что синтезированные *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арены в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат*, функционализированные по нижнему ободу полиаминными фрагментами, конденсируют ДНК из тимуса телёнка в наноразмерные частицы (< 100 нм).

Основное содержание работы отражено в следующих публикациях

1. Puplampu, J.B. Synthesis of p-tert-butylthiacalix[4]arenes functionalized with tris(2-aminoethyl)amine fragments at the lower rim and their interaction with model lipid membranes / J.B. Puplampu, L.S. Yakimova, A.A. Vavilova, D.A. Fayzullin, Yu.F. Zuev, I.I. Stoikov // Macroheterocycles. - 2014. - V. 7. - P.337-344.
2. Пуплампу, Дж.Б. Синтез новых типов ПАМАМ-дендримеров на основе *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена / Дж.Б. Пуплампу, Л.С. Якимова, И.Х. Ризванов, И.И. Стойков // Бутлеровские сообщения. - 2014. - Т.39. - №8. - С.65-71.
3. Пуплампу, Дж.Б. Синтез производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена, функционализированных по нижнему ободу фрагментами N-(2-гидроксиэтил)этилендиамина, в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат* и их взаимодействие

с ДНК / Дж.Б. Пуплампу, Л.С. Якимова, И.Х. Ризванов, И.И. Стойков // Бутлеровские сообщения. - 2014. - Т.39. - №8. - С.57-64.

4. Пуплампу, Дж.Б. Синтез тетразамещенных по нижнему ободу *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов, функционализированных трис(2-аминоэтил)амином / Дж.Б. Пуплампу, Е.А. Юшкова, И.И. Стойков // Сборник тезисов Всероссийской конференции «Органический синтез: химия и технология». - Екатеринбург, 2012. - С. 90.

5. Пуплампу, Дж.Б. Синтез *n*-трет-бутилкаликс[4]аренов, способных взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами / Дж.Б. Пуплампу, Е.А. Юшкова, И.И. Стойков // Тезисы докладов XV Молодежной школы-конференции по органической химии - Уфа, 2012. – С. 218.

6. Пуплампу, Дж.Б. Синтез бис(3-аминопропил)амино производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена как потенциальных агентов трансфекции / Дж.Б. Пуплампу, Л.С. Якимова, И.И. Стойков // Сборник тезисов Всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» - Казань, 2014. – С. 305.

7. Пуплампу, Дж.Б. Альтернативный подход к получению рецепторов на ДНК: tren-производные *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена / Дж.Б. Пуплампу, Е.А. Юшкова, И.И. Стойков // Тезисы докладов XI Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века» - Казань, 2012. – С. 57.